

Morphological and physiological diversity of native strains of *Trichoderma* spp. in soils with cocoa cultivation in México

Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros de México

Arrazate-Argueta, Víctor del C.¹; Martínez-Bolaños, Misael²; Ayala-Escobar, Victoria¹; Avendaño-Arrazate, Carlos Hugo²; Hernández-Morales, Javier¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Estado de México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Rosario Izapa. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

*Autor de correspondencia: hjavier@colpos.mx

ABSTRACT

Objective: To study the morphological, microscopic and physiological diversity of native species of *Trichoderma* genus associated with soils with cocoa cultivation in Mexico.

Design/methodology/approximation: Colonies of *Trichoderma* spp. were isolated and characterized morphologically, microscopically and physiologically. from soil samples from six sites with different agronomic management: Organic Management, Conventional and No Management. A multivariate analysis (Analysis of Main Components and Analysis of Hierarchical Conglomerates) was carried out based on eight morphological characters of the colonies: shape, mycelium texture, obverse color, reverse color, central halo, number of concentric rings, type of sporulation and sporulation capacity; three microscopic characters: conidia shape and length / width relation of conidia and phialides.

Results: Thirty strains with macroscopic characteristics of the genus *Trichoderma* were isolated and purified. The Principal Components Analysis showed that the first three components expressed 66.27% of the total variability in the 30 strains of *Trichoderma* spp., observing a wide distribution of the strains from the analysis of the evaluated characters. The analysis of hierarchical clusters determined eight groups divided into subgroups from the semipartial correlation coefficient of 0.05.

Limitations of the study/implications: *Trichoderma* species show intraspecific variation that change with respect to the environmental conditions of the environment where they grow.

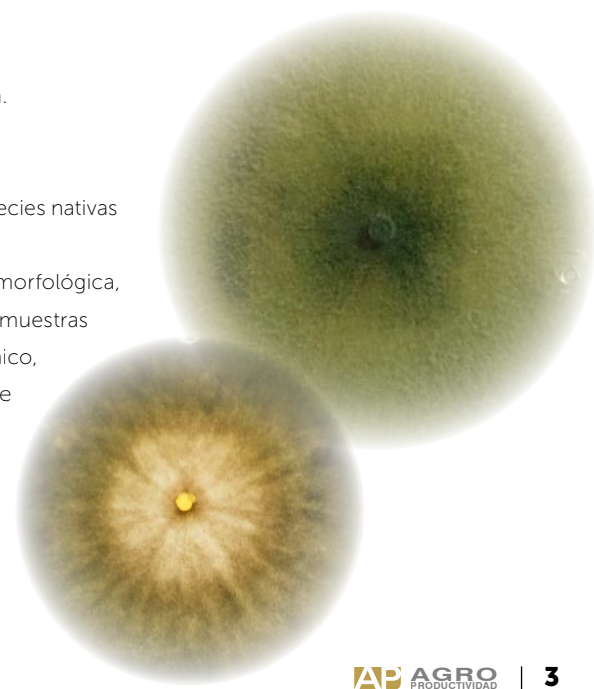
Findings/conclusions: The morphological, microscopic and physiological characterization shows a high variability expressed in different characters that demonstrate the high diversity and specificity of *Trichoderma* spp. in soils with cocoa cultivation in Mexico.

Key words: *Theobroma cacao* L., agroecosystem, mycobiota, characterization.

RESUMEN

Objetivo: Estudiar la diversidad morfológica, microscópica y fisiológica de especies nativas del género *Trichoderma* asociadas a suelos cacaoteros de México.

Diseño/metodología/aproximación: Se aislaron y caracterizaron morfológica, microscópica y fisiológicamente, colonias de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo de seis sitios con diferente manejo agronómico: Manejo Orgánico, Convencional y Sin Manejo. Se realizó un análisis multivariado (Análisis de Componentes Principales y Análisis de Conglomerados Jerárquicos) a partir



de ocho caracteres morfológicos de las colonias: forma, textura del micelio, color anverso, color reverso, halo central, número de anillos concéntricos, tipo de esporulación y capacidad de esporulación; tres caracteres microscópicos: forma de conidios y relación largo/ancho de conidios y fiálides.

Resultados: Se aislaron y purificaron 30 cepas con características macroscópicas del género *Trichoderma*. El Análisis de Componentes Principales mostró que los primeros tres componentes expresaron el 66.27 % de la variabilidad total en las 30 cepas de *Trichoderma* spp., observando una amplia distribución de las cepas a partir del análisis de los caracteres evaluados. El Análisis de Conglomerados Jerárquicos determinó ocho grupos divididos en subgrupos a partir del coeficiente de correlación semiparcial de 0.05.

Limitaciones del estudio/implicaciones: Las especies de *Trichoderma* muestran variación intraespecífica que cambian con respecto a las condiciones ambientales del medio donde crecen.

Hallazgos/conclusiones: La caracterización morfológica, microscópica y fisiológica, muestra una alta variabilidad expresada en diferentes caracteres que demuestran la alta diversidad y especificidad de las especies de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros de México.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., agroecosistema, micobiota, caracterización.

género *Trichoderma*. Estos hongos son componentes predominantes de la micobiota del suelo en varios ecosistemas (De Bellis *et al.*, 2007) y funcionan como antagonistas eficaces en el manejo integrado de hongos fitopatógenos en diversos cultivos (Stefanova, 2007). Los hongos del género *Trichoderma* son asexuales (anamorfos) con especies genéticamente vinculadas al género *Hypocrea* (teleomorfo), presentes en el suelo, raíz y follaje de plantas (Samuels, 2004).

En estudios sobre diversidad de *Trichoderma/Hypocrea* en el agroecosistema cacao, Rivas-Cordero y Pavone-Maniscalco (2010) mencionan la presencia de especies como: *T. harzianum*, *T. virens*, *T. brevicompactum*, *T. theobromicola*, *T. koningiopsis*, *T. ovalisporum*, *T. asperellum*, y *T. pleurotum*. Así mismo, Migheli *et al.* (2009) y Torres-de la Cruz *et al.* (2015) reportan a *T. harzianum* como la más abundante. Por lo anterior, el objetivo fue estudiar la diversidad morfológica, microscópica y fisiológica de especies nativas del género *Trichoderma* asociadas a en suelos cacaoteros establecidos en los estados de Yucatán, Chiapas y Tabasco del sureste de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo

Se colectaron muestras de suelo en seis parcelas productoras de cacao en el Sureste de México. Las muestras correspondieron a tres sistemas de manejo agronómico: Manejo Orgánico, Convencional y Sin Manejo (Cuadro 1).

Se utilizó el método cinco de oro para obtener una muestra representativa de 1 kg por cada sitio de muestreo, resguardada en bolsas

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos agrícolas más importantes de los trópicos húmedos de México (Ten Hoopen *et al.*, 2012), donde se cultiva un total de 59,554 ha distribuidas en los estados de Tabasco, Chiapas y Guerrero (SIAP, 2019). Las plantaciones de cacao se caracterizan por ser un agroecosistema arbolado de sombra y de amplia diversidad florística, debido a las condiciones climáticas donde se cultiva y por establecerse bajo un dosel diversificado, haciendo que este agroecosistema tenga similitud con las selvas tropicales (Greenberg *et al.*, 2000). Desde el punto de vista ecológico y de control natural de plagas, el agroecosistema de cacao ha sido uno de los más estudiados (Evans, 1998), debido a que presenta características atractivas para estudios de diversidad y establecimiento de sistemas de manejo agroecológico. Sin embargo, la biodiversidad contenida en este tipo de agroecosistema se puede ver afectado por el grado de modificación o la intensidad del manejo agronómico, afectando la composición y abundancia de la biota asociada (Matson *et al.*, 1997).

Estudios en México, han confirmado una alta diversidad animal (Greenberg *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2005; Pérez-de la Cruz, 2009) y vegetal (Ramírez-Meneses, 2013) dentro del agroecosistema cacao. Sin embargo, Torres-de la Cruz *et al.* (2015) mencionan que los trabajos de diversidad de hongos en suelo han sido poco estudiados.

Las características únicas de este agroecosistema sugieren la existencia de una amplia diversidad de especies de hongos asociados con la rizosfera de plantas o de manera endófitas (Harman *et al.*, 2004), incluidas especies del

de plástico y transportado al Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Rosario Izaapa, ubicado en Tuxtla Chico, Chiapas, México.

Aislamiento de especies del género *Trichoderma*

Los aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvieron por el método de dilución de esporas en cajas Petri (Acuña y Peña, 2005). Se preparó una solución madre en un matraz con 90 mL de agua destilada y esterilizada +10 g de suelo. La solución se agitó durante un minuto hasta homogeneizar completamente. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , tomando una alícuota de 1 mL de la solución y 9 mL de agua destilada y esterilizada. Se incubó 0.1 mL de cada dilución en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) + Ampicilina ($200 \mu\text{L L}^{-1}$) y Ácido Láctico ($600 \mu\text{L L}^{-1}$), distribuyendo uniformemente la mezcla en toda la superficie del medio. Las cajas fueron incubadas a 25 °C durante 3 días y cuantificado el número de colonias del género *Trichoderma*. Las colonias fueron aisladas en cajas Petri con medio de cultivo Agua Agar (AA). La purificación de cada aislado de *Trichoderma* se hizo a través del método de punta de hifa, tomando la sección final de la hifa en crecimiento e incubado en cajas Petri con medio de cultivo PDA.

Cuadro 1. Sitios de colecta de muestras de suelos cacaoteros en el sureste de México.

Sitio	Lugar de muestreo	Manejo agronómico
1	El Triunfo, Escuintla, Chiapas	Sin Manejo
2	Maravilla Tenejapa, Chiapas	Sin Manejo
3	Pichucalco, Chiapas	Orgánico
4	Unión Jamaica, Escuintla, Chiapas	Orgánico
5	Valladolid, Yucatán	Sin Manejo
6	Zunú, Tlacotalpa, Tabasco	Convencional

Caracterización morfológica y fisiológica de especies del género *Trichoderma*

Se incubaron discos de 5 mm en el centro de cajas Petri con medio de cultivo PDA para cada cepa pura. Las características morfológicas y fisiológicas de las colonias de *Trichoderma* se identificaron siguiendo

la guía de Barnett y Hunter (1972), Samuels et al. (2002) y Gams y Bissett. (1998), considerando características morfológicas de las colonias como: Forma (FC), Color Anverso (CA), Color Reverso (CR), Textura del Micelio (TM), Halo Central (HC), Número de Anillos Concéntricos (NAC), Tipo de Esporulación (TE), Capacidad de Esporulación (CE); características microscópicas: Forma de conidios (FCON), Relación Largo/Ancho de conidios (RLAC), Relación Largo/Ancho de fiálides (RLAF); y características fisiológicas como la Tasa de Crecimiento (TC) (Cuadro 2). La FC, CA, CR, TM, HC y TC, se evaluó a los tres días de incubación y la NAC, TE, CE, FCON, RLAC y RLAF a los seis días de incubación en medio de cultivo PDA a 25 °C.

Se realizó un análisis multivariado con el paquete estadístico SAS® (Statistical Analysis System, versión 9.4) utilizando datos cualitativos y cuantitativos. Se hizo un Análisis de Componentes Principales (ACP) para observar la distribución de las cepas caracterizadas y un Análi-

Cuadro 2. Caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de *Trichoderma* spp., evaluados para estudiar la diversidad de especies nativas en el sureste de México.

Carácter	Código	Escala
Forma	FC	1: Circular, 2: Irregular y 3: Filamentosa
Textura del micelio	TM	1: Polvorienta, 2: Granulosa, 3: Velloso, 4: Aterciopelada y 5: Algodonosa
Color anverso	CA	1: Blanco, 2: Blanco-Marrón, 3: Amarillo-Verdoso y 4: Amarillo
Color reverso	CR	1: Blanco, 2: Blanco-Amarillento, 3: Blanco-Verdoso y 4: Amarillo
Halo central	HC	1: Ausente, 2: Micelial-Hialino, 3: Micelial-Algodonoso y 4: Esporulativo
Número de anillos concéntricos	NAC	0: Sin anillos, 1: Un anillo, 2: Dos anillos y 3: Tres anillos
Tipo de esporulación	TE	1: Ausente, 2: Dispersa, 3: Homogénea y 4: Anular
Capacidad de esporulación	CE	1: Baja, 2: Media y 3: Alta
Tasa de crecimiento	TC	Cm
Relación largo/ancho de conidios	RLAC	μm
Forma de conidios	FCON	1: Globoso, 2: Subgloboso, 3: Elipsoidal y 4: Ovoides
Relación largo/ancho de fiálides	RLAF	μm

sis de Conglomerados Jerárquicos (ACJ) para distinguir grupos conformados por las mismas (Gonzalez, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de especies del género *Trichoderma*

Se aislaron y purificaron 30 cepas con características macroscópicas del género *Trichoderma*. El sitio dos (Maravilla Tenejapa, Chiapas) resaltó por obtenerse el mayor número de cepas (10), representando el 33.33 % del total de cepas encontradas; además, el sitio estuvo asociado a un bajo nivel de perturbación por no realizarse actividades de manejo agronómico. Perfecto *et al.* (1996) resaltan que los agroecosistemas tradicionales de cacao pueden contener altos niveles de biodiversidad en flora y fauna, debido a su estructura bajo diferentes especies de árboles, siendo, junto con el café, uno de los modelos más atractivos para la conservación de la biodiversidad.

En el sitio cinco (Valladolid, Yucatán) y seis (Zunú, Tlacoatlpa, Tabasco) se encontró solo una cepa, respectivamente; que representó, para cada sitio, el 3.33 % del total de cepas encontradas.

El sitio cinco representó el menor porcentaje de cepas encontradas. Importante destacar que este sitio estuvo asociado a un agroecosistema sin actividades de manejo agronómico. Esto sugiere que las características físico-químicas del suelo pueden influir en el desarrollo de hongos del género *Trichoderma*. Elíades *et al.* (2004) encontraron especies como *T. koningii* y *T. hamatum* hasta pH=7, considerándolas alcalofóbicas en pH superiores, ya que únicamente crecieron en medios ligeramente ácidos. Lo que es confirmado por Wicklow (1986) donde afirma que la presencia de hongos del género *Trichoderma* está fuertemente regulada por el calcio en la solución edáfica.

El sitio seis, al igual que el sitio cinco, estuvo asociado al manejo agronómico tradicional del cultivo, por lo que se puede presumir algún grado de perturbación en la biodiversidad. Perfecto *et al.* (2003) mencionan que los agroecosistemas pueden ser grandes repositorios de biodiversidad, pero el tipo de agricultura puede determinar la biodiversidad contenida en ellos. De la misma manera, Philpott *et al.* (2006) menciona que la intensidad del manejo o intensificación de la agricultura es la transición entre un agroecosistema de alta biodiversidad a uno de baja biodiversidad con el uso de ma-

quinaria y agroquímicos. Lecointre y Le Guyader (2006) encontraron que organismos del suelo y hojarasca son altamente susceptibles al uso de pesticidas. Estudios *in vitro* realizados por Terreno *et al.* (2018) con fungicidas de uso común para combatir enfermedades en cacao, encontraron que los fungicidas a base de óxido de cobre inhiben la presencia de especies del género *Trichoderma* como: *T. harzianum*, *T. ovalisporum*, *T. stromaticum* y *T. koningiiopsis*.

Caracterización morfológica y fisiológica de especies del género *Trichoderma*

Las características morfológicas cualitativas se presentan de manera gráfica, señalando las frecuencias de cada nivel del carácter dentro de cada descriptor (Figura 1).

Las variables FC y TM mostraron frecuencias constantes, con forma circular y micelio algodonoso en todas las colonias. El CA blanco (Figura 2a) mostró la mayor frecuencia (43.33 %) y el CA amarillo (Figura 2d) en menor frecuencia (10 %). El CR blanco-verdoso (Figura 2g) mostró la mayor frecuencia (40 %) y en menor frecuencia (13.33 %) el CR amarillo (Figura 2h).

El HC micelial hialino (Figura 3b) presentó la mayor frecuencia (33.33 %) y con menor frecuencia (6.67 %) el HC micelial algodonoso (Figura 3c).

El NAC fue variable, donde la mayor frecuencia (46.67 %) mostró dos anillos y en menor frecuencia (3.33 %) tres anillos. El TE anular (Figura 4d) mostró la mayor frecuencia (36.67 %) y en menor frecuencia (3.33 %) no se observó esporulación (Figura 4a). La CE alta (Figura 4c y 4d) mostró la mayor frecuencia

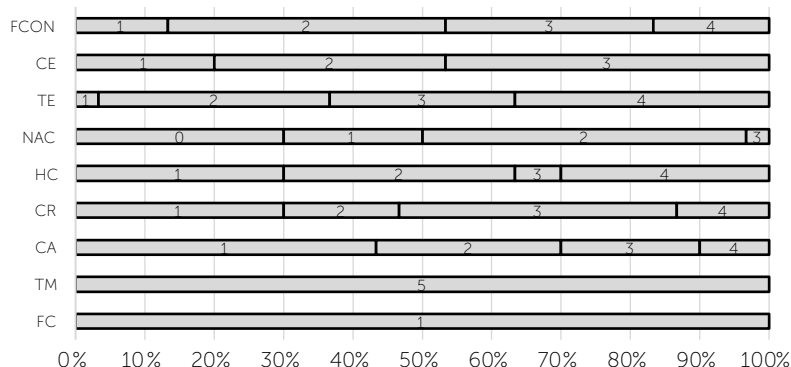


Figura 1. Frecuencia por clase de caracteres morfológicos (9) de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. encontradas en cacaotales del sureste de México. FC=Forma de la colonia, TM=Textura del micelio, CA=Color anverso de la colonia, CR=Color reverso de la colonia, HC=Halo central de la colonia, NAC=Número de anillos concéntricos, TE=Tipo de esporulación, CE=Capacidad de esporulación y FCON=Forma de conidios.



Figura 2. Color anverso y reverso de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo PDA. a-d=Color anverso a los tres días de incubación; a: Blanco; b: Blanco-Marrón; c: Amarillo-Verdoso; d: Amarillo. e-h=Color reverso a los 6 días de incubación; e: Blanco; f: Blanco-Amarillento; g: Blanco-Verdoso y h: Amarillo.

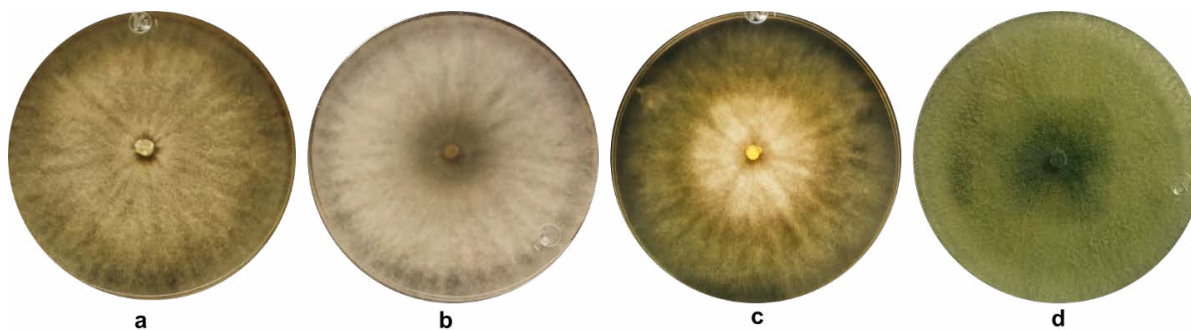


Figura 3. Halo central de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a los tres días de incubación a 25 °C en medio de cultivo PDA. a: Ausente; b: Micelial-Hialino; c: Micelial-Algodonoso y d: Esporulativo.



Figura 4. Tipo de esporulación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a los seis días de incubación a 25 °C en medio de cultivo PDA. a: Ausente; b: Dispersa; c: Homogénea y d: Anular.

(46.67 %) y en menor frecuencia (20 %) la esporulación baja a nula (Figura 4a).

Análisis de Componentes Principales (ACP)

El ACP mostró que los primeros tres componentes expresaron el 66.27 % de la variabilidad total en las 30 cepas de *Trichoderma* spp., donde el CP1 explicó el 35.54 %, el CP2 15.85 % y el CP3 14.87 % (Cuadro 3).

En la Figura 5a se observa la distribución de las cepas con base al CP1 y CP2 y en la Figura 5b con base al CP1 y CP3, observando una amplia distribución de las cepas a partir del análisis de los caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de *Trichoderma* spp.

Análisis de Conglomerados Jerárquicos (ACJ)

Con las variables morfológicas, microscópicas y fisiológicas, se determinaron ocho grupos (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, GVII y GVIII) divididos en subgrupos a partir del coeficiente de correlación semiparcial de 0.05 (Figura 6).

Las cepas del G I (1, 2, 27 y 29) presentaron esporulación homogénea, capacidad de esporulación alta y sin formación de anillos concéntricos. El G II (20) presentó la relación largo/ancho de conidios más alta (1.93). El G III (5) presentó la tasa de crecimiento más baja (4.2 cm). El G IV

Cuadro 3. Valores propios y proporción de la varianza total explicada por componente principal, basado en caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de *Trichoderma* spp. encontradas en cacaotales del sureste de México.

CP	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulado
1	3.5542501	1.9690284	0.3554	0.3554
2	1.5852217	0.0978187	0.1585	0.5139
3	1.4874031	0.3730124	0.1487	0.6627

CP=Componente principal.

(19, 22, 23, 26, 28 y 30) presentó color anverso amarillo-verdoso, color reverso blanco-verdoso, halo central esporulativo, dos anillos concéntricos, esporulación anular y una alta capacidad de esporulación. El G V (21 y 25) presentó color anverso blanco. El G VI (3, 7 y 8) presentó un anillo concéntrico y baja capacidad de esporulación. El G VII (15 y 24) presentó color anverso blanco-marrón y sin formación de halos centrales. El G VIII (4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18) presentó esporulación dispersa y capacidad de esporulación media.

El color anverso y reverso de las colonias pueden estar influenciados por la producción de pigmentos como la Antraquinona (Druzhinina y Kubicek, 2005) y otros metabolitos secundarios como antibióticos y promotores del crecimiento vegetal (Vinale *et al.*, 2009).

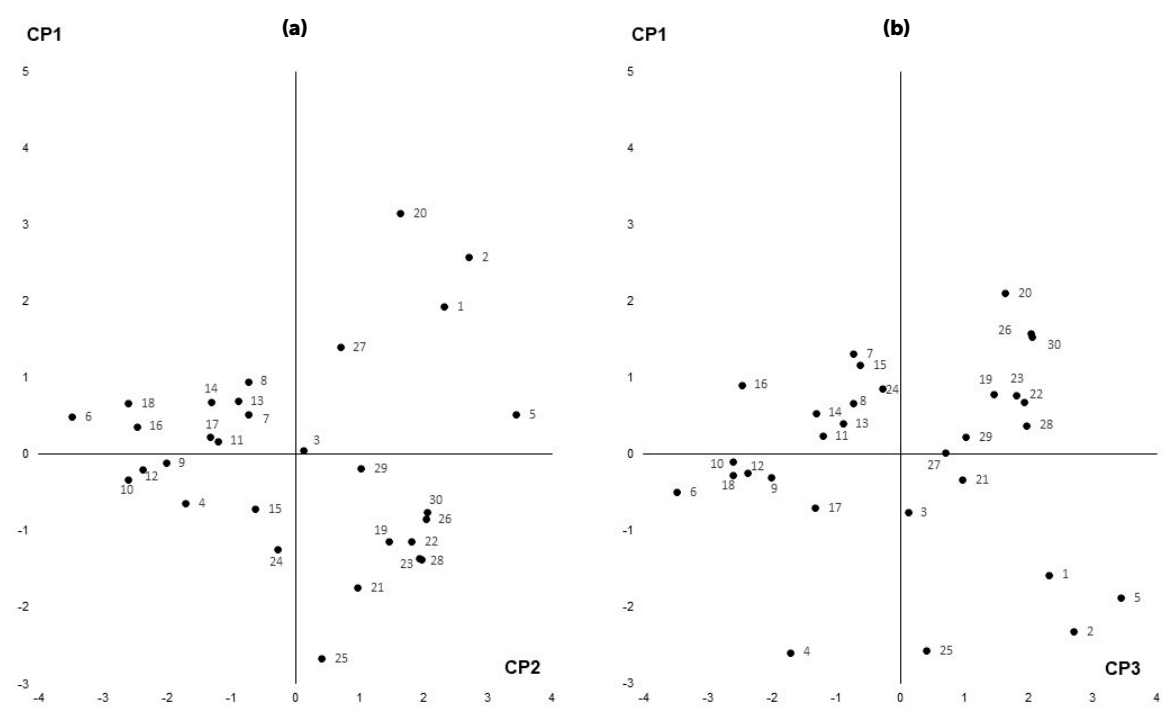


Figura 5. Distribución de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. encontradas en cacaotales del sureste de México. a: Distribución en función de los componentes principales 1 y 2 (CP1=componente principal 1 y CP2=componente principal 2). b: Distribución en función de los componentes principales 1 y 3 (CP1=componente principal 1 y CP3=componente principal 3).

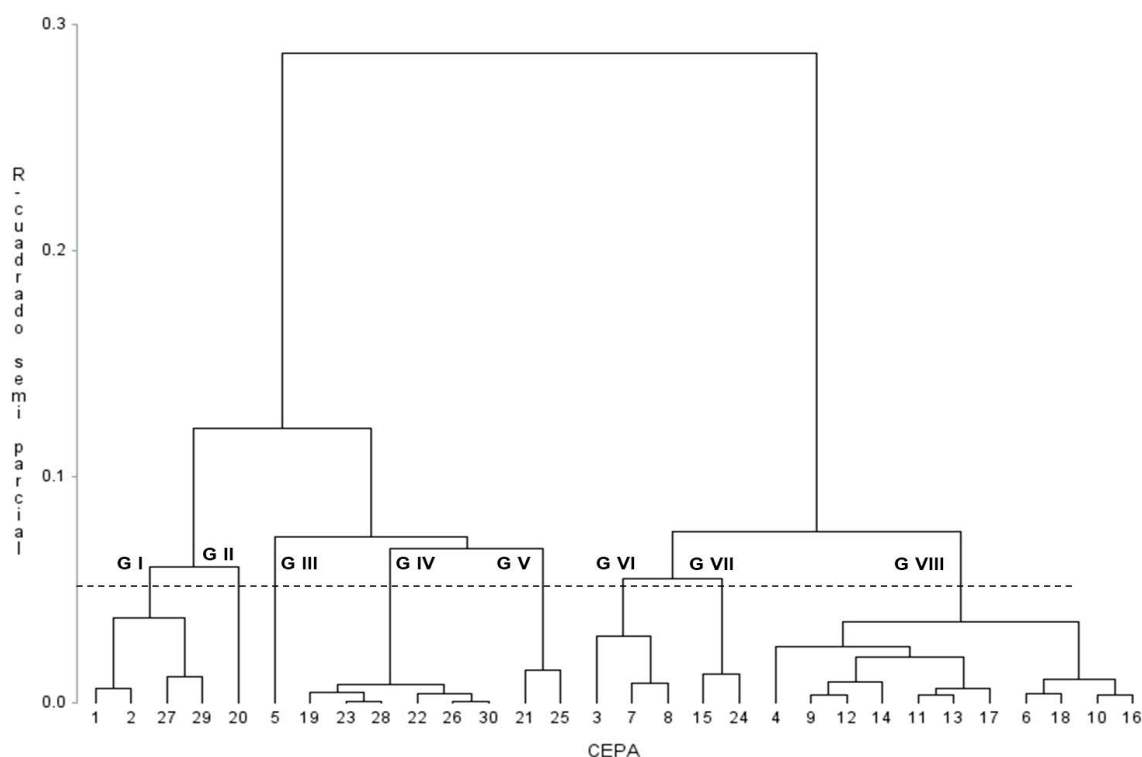


Figura 6. Dendrograma de caracteres cualitativos y cuantitativos para 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. encontradas en cacaotales del sureste de México. GI=Grupo uno, GII=Grupo dos, GIII=Grupo tres, GIV=Grupo cuatro, GV=Grupo cinco, GVI=Grupo VII y GVIII=Grupo ocho.

La forma de las colonias y cantidad de conidiación observada en las placas, puede ser estimulada por factores que propician un ambiente de estrés, como son: la exposición a la luz, la falta de nutrientes o cambios en pH (Osorio-Concepción et al., 2013).

La utilización de fuentes de nutrientes y la adaptación a condiciones ambientales específicas de cada especie nativa de *Trichoderma* spp. pudo ser un indicador de la diversidad observada, al someter todos los organismos a las mismas condiciones de temperatura, humedad relativa, luz, pH y nutrientes.

CONCLUSIONES

La calidad de los suelos y la perturbación con la intensificación de la agricultura influye en la diversidad de especies de *Trichoderma* spp. en el agroecosistema cacao.

La caracterización morfológica, microscópica y fisiológica, muestra una alta variabilidad expresada en diferentes caracteres que demuestran la alta diversidad y especificidad de las especies de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros del sureste de México.

LITERATURA CITADA

- Acuña, O. & Peña, W. (2005). Determinación de poblaciones de microorganismos en el suelo mediante técnicas de recuento directo. Eds. Imbap, Universidad de Costa Rica. San José, CR. pp. 4-7.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd edition, 241 p.
- De Bellis, T., Kernaghan, G. & Widden, P. (2007). Plant community influences on soil microfungus assemblages in boreal mixed-wood forests. *Mycologia* 99: 356–367.
- Druzhinina, I. & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University Sci B*. 2005 (2): 100-112.
- Eliades, L., Bucsinszky, A. M. & Cabello, M. (2004). Micobiota alcalofílica y alcalinotolerante en suelos de bisques xéricos en una localidad de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Boletín Micológico* 19: 41-47.
- Evans, H. C. (1998). Disease and sustainability in the Cocoa agroecosystem. First International Workshop on Sustainable Cocoa Growing. Smithsonian Tropical Research Institute. Panama City, Panama.
- Gams, W. & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma and Gliocladium*, Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Harman, G. E. and C. P. Kubicek (Eds.). Taylor and Francis, London, UK., pp:3-34.
- González-Andrés, F. & Pita-Villamil, J. M. (2001). Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos. Ed. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Madrid. 279 p.

- Greenberg, R., Bichier, P. & Cruz, A. A. (2000). The conservation value for birds of cacao plantations with diverse planted shade in Tabasco, Mexico. *Animal Conservation* 3: 105-112.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A. & Chet, I. (2004). *Trichoderma* spp. opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Lecointre, G. & Le Guyader, H. (2006). The Tree of Life: A Phylogenetic Classification. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, MA, USA.
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G. & Swift, M. J. (1997). Agricultural intensification and ecosystems properties. *Science* 277: 504-509.
- Migheli, Q., Balmas, V., Komon-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S. & Kopchinskiy, A. G. (2009). Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by Paneuropean, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology* 11: 35-46.
- Muñoz, D., Estrada, A. & Naranjo, E. (2005). Monos aulladores (*Alouatta palliata*) en una plantación de cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México: aspectos de la ecología alimentaria. *Universidad y Ciencia* 2: 35-44.
- Osorio-Concepción, M., Casas-Flores, S. & Cortés-Penagos, C. (2013). Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista Mexicana de Micología* 37: 41-50.
- Pérez-De la Cruz, M., Equihua-Martínez, A., Romero-Nápoles, J., Sánchez-Soto, S., García-López, E. y Bravo-Mojica, H. (2009). Escolitidos (Coleoptera: Scolytidae) asociados al agroecosistema cacao en Tabasco, México. *Neotropical Entomology* 38: 602-609.
- Perfecto, I., Rice, R. A., Greenberg, R. & Van der Voort, M. (1996). Shade coffee: a disappearing refuge of biodiversity. *Bioscience* 46: 598-608.
- Perfecto, I., Mas, A., Dietsch, T. V. & Vandermeer, J. (2003). Species richness along an agricultural intensification gradient: a tri-taxa comparison in shade coffee in southern México. *Biodiversity and Conservation* 12: 1239-1252.
- Philpott, S. M., Perfecto, I. & Vandermeer, J. (2006). Effect of management intensity and season on arboreal ant diversity and abundance in coffee agroecosystems. *Biodiversity and Conservation* 15: 139-155.
- Ramírez-Meneses, A., García-López, E., Obrador-Orlán, J., Ruiz-Rosado, O. & Camacho-Chiu, W. (2013). Diversidad florística en plantaciones agroforestales de cacao en Cárdenas, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 29 (3): 215-230.
- Rivas-Cordero, M. & Pavone-Maniscalco, D. (2010). Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. *Interciencia* 35: 777-783.
- Samuels, G. (2004). *Trichoderma: a guide to identification and biology*. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Systematic Botany and Mycology Laboratory. Beltsville, USA. 40 p.
- SIAP. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo 2016. Avance de siembras y cosechas por cultivo Consultado: 12 de octubre 2019. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do
- Stefanova, M. (2007). Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Ciudad de La Habana, Cuba. *Fitosanidad* 11 (3): 75-79.
- Ten Hoopen, G.M., Deberdt, P., Mbenoun, M. & Cilas, C. (2012). Modelling cacao pod growth: implications for disease control. *Annals of Applied Biology* 160: 260-272.
- Terreno, Y. P.I., Peñaherrera, V. S. L., Solís, H. Z. K., Vera, C. D. I., Navarrete, C. J. B. & Herrera, D. M. A. (2018). Compatibilidad *in vitro* de *Trichoderma* spp. con fungicidas de uso común en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Investigación Agraria* 20 (2): 146-151.
- Torres-de la Cruz, M., Ortiz-García C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N. & Capello-García, S. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 947-961.
- Vinale, F., Ghisalberti, E., Sivasitphamparab, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S. and Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters of Applied Microbiology* 72: 2032-2035.
- Wicklow, D. T. (1986). Functional relationship between Quebec forest soil microfungi and their environment. *Canadian Journal of Botany* 64 (7): 1424-1432.

